

修 士 学 位 論 文

題 名

タンパク質凝集条件下での BAG6-UBL4A 複合体の解離

指導教員

川原 裕之 教授

2019年 1月 10日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科

生命科学

専攻

学修番号 17881333

氏 名 萩原 拓海

目次

2 : 目次

3 : 要旨

5 : abstract

6 : abstract 英文

7 : 略語表

8 : 実験手法

11 : 結果

13 : Figure

要旨

リボソームで合成されたポリペプチドは正しく折りたたまれることで固有の機能を発揮する。しかし、熱ストレスや mRNA のスプライシング異常など多くの理由により、新合成されたポリペプチドの約 3 割は適切な折りたたみに失敗する。不良構造をもつタンパク質の多くは分子表面に疎水性残基を露出し、親水性サイトソル中で凝集体を形成する要因となる。細胞毒性の高いタンパク質凝集体形成を防ぐため、細胞内には不良タンパク質を速やかに認識し分解する機構が存在する。事実、プロテアソーム阻害剤 **MG-132** 処理によりユビキチン依存的分解系を阻害すると、不良タンパク質が凝集したユビキチン陽性凝集体アグリソームの形成が促進する。

先行研究により、不良タンパク質の凝集抑制に関わる因子として **BAG6** が同定された。**BAG6** は不良タンパク質の疎水性領域を認識し、これらの凝集を防ぎつつユビキチン-プロテアソーム依存的分解へと導く。また、**BAG6** は **UBL4A** と複合体を形成することで、テイルアンカー型膜タンパク質の生合成にも関与することが報告されている。これまで、**UBL4A** がユビキチン依存的タンパク質分解に関与する報告はないが、当研究室の先行研究では、細胞内タンパク質分解系を阻害した時、あるいはタンパク質凝集体を形成させた時に、**UBL4A** と **BAG6** との相互作用が低下する可能性が見出されている。しかし、このことの意義と再現性は十分に検討されていない。そこで私は、凝集体形成条件下で、**BAG6-UBL4A** 複合体が解離する可能性に着目して本研究を開始した。

プロテアソーム阻害により不良タンパク質を過剰に蓄積させた細胞内で、**BAG6** はアグリソーム画分に移行することが報告されている。そこで私は、**UBL4A** が **BAG6** と共にアグリソーム画分へ移行する可能性を、細胞分画法を用いて検討した。その結果、**BAG6** はアグリソーム画分に集積する一方で、**UBL4A** はアグリソーム画分には検出されないことを見出した。これらの結果は、次の二つの可能性を示唆する。一つは、アグリソーム形成時に、**BAG6-UBL4A** 複合体が解離する可能性、もう一つは、もともと **UBL4A** と結合していない **BAG6** のプールが細胞内に存在し、それが特異的にアグリソーム移行した可能性である。この二つの可能性を区別するために、私は **BAG6-UBL4A** 複合体の解離を定量的かつ迅速に検出できるスプリットルシフェラーゼシステム **NanoBiT** を新しく構築した。構築した **NanoBiT** 実験系は、**BAG6** と **UBL4A**、それぞれの結合ドメイン間の相互作用を十分な感度で検出することが可能であった。さらに、**BAG6** との解離定数を 10^{-3} 倍低下させることが示されている **UBL4A** 点変異体(**F107A**)では、**NanoBiT** 定量値が有為に低下することを確認し、この実験系が **BAG6** と **UBL4A** との細胞内相互作用を特異的に検出できることも確認した。しかし、凝集体形成条件下での定量を行うと、試行毎の測定値のぶれが大きく、誤差範囲を超える値の差の検出には至らず、引き続き実験条件の検討を行っている。

私は次に、**UBL4A** の結合能が低下した **BAG6** 変異体を強制的に増やすことが、凝集体形成に及ぼす影響を検討した。その結果、**BAG6** 変異体の発現は、プロテアソーム阻害剤の添加をしなくてもユビキチン陽性凝集体形成を促進し、細胞生存率に影響を与える可能性を見出した。ただし野生型 **BAG6** 発現との比較が今後必須となる。この結果は、**BAG6** と **UBL4A** との複合体形成は凝集体形成に抑制的に機能している可能性を示している。

精製 UBL4A、ならびに BAG6 タンパク質を用いた表面プラズモン共鳴実験から、両者の結合解離定数は極めて低く ($K_d=2.0 \times 10^{-9} \text{M}$), 解離はあり得ないほど強固な複合体が形成されることが明らかにされている。一方、凝集体形成の誘導条件下では、細胞内に複合体形成していない BAG6 が存在している可能性が本研究から初めて示された。このことは、UBL4A と BAG6 との相互作用の変化が凝集体形成調節のプロセスと関連しうることを示唆している。

Yamamoto, K., Hayashishita, M., Minami, S., Suzuki, K., Hagiwara, T., Noguchi, A., and Kawahara, H. (2017) Elimination of a signal-sequence uncleaved form of defective HLA protein through BAG6. **Sci. Rep.** 7, DOI:10.1038/s41598-017-14975-9

Abstract

TA タンパク質の埋め込みを行っている **BAG6-UBL4A** 複合体、その複合体は不良タンパク質をトラップして分解に導く機能をもつことが知られている。**BAG6** は安定したタンパク質であるのに対して、**UBL4A** は半減期が短く細胞内で効率よく代謝が行われている。この事実、**BAG6-UBL4A** 間の解離定数を考えると矛盾する。さらに、不良タンパク質を蓄積させた際に **UBL4A** によって沈降できる **BAG6** 量が低下するという知見が当研究室の先行研究より得られていた。わたしはこの挙動に着目し研究を行った。

その結果、**BAG6**, **UBL4A** はアグリソーム形成時にそれぞれ単独で存在することを明らかにした。**UBL4A** との結合能低下変異体を細胞内に過剰に発現させると、野生型の過剰発現に対して、より細胞毒性を持つことが示された。また、**UBL4A** 過剰発現時には **BAG6** がアグリソーム画分に移行しないという知見を得ることが出来た。

この知見は、**BAG6** の2つの機能が同時ではなく **UBL4A** との複合体の形成の有無で変化しているということを後押しする。

Abstract

Laboratory of Cellular Biochemistry

Takumi Hagiwara

BAG6-UBL4A complex is a multifunctional complex that was reported to be needed for insertion of tail-anchored protein into the ER membrane. This complex also possesses a function to recognize and eliminate the aggregation-prone disordered proteins. While BAG6 itself is a stable protein, its binding partner UBL4A is a short half-life protein, and is efficiently degraded by proteasome in the cell.

Although the dissociation constant (K_d) between purified BAG6 and UBL4A proteins is extremely low, previous study suggested that efficiency of co-precipitation of BAG6 with UBL4A was greatly decreased when the cells were treated with a proteasome inhibitor, MG132. The reason why BAG6 and UBL4A were dissociated in MG132-treated cells was not elucidated to date. Therefore, I focused on this phenomenon in this study.

In this study, I found that BAG6 and UBL4A exist independently in MG132-induced protein aggregates called aggresomes. I also found over-expression of a BAG6 mutant which possesses compromised affinity with UBL4A was shown to be more cytotoxic compared to the case in wild type BAG6. In addition, I found that BAG6 was not incorporated into the aggresome when UBL4A was overexpressed.

These findings support a hypothesis that the BAG6 possesses possible two distinct functions, one is UBL4A and the other is independent to complex formation with UBL4A.

略語表

PBS Phosphate buffered salts

実験方法

1-1 免疫染色法によるアグリソームの検出

MG-132 処理を行った HeLa 細胞を、抗ポリユビキチン抗体(FK2)、ならびに抗 BAG6 抗体を用いて免疫染色法を用い、アグリソームを検出した。HeLa 細胞は、4%パラホルムアルデヒドを溶かした PBS で 15 分処理することで固定し、その後 0.1%Triton-X100 を含んだ PBS で透過処理を行い、3%BS を含んだ PBS でブロッキングを行った。

使用した抗体は、一次抗体として FK2 モノクローナル抗体 (100 倍希釈)、ならびに BAG6 ポリクローナル抗体 (100 倍希釈)、2 次抗体は Alexa-488 anti-mouse IgG 抗体 (100 倍希釈)、Alexa-594 anti-rabbit IgG 抗体 (100 倍希釈) で免疫染色を行った。

1-2 アグリソーム画分における UBL4A タンパク質の検出

3x Flag タグを付加した UBL4A タンパク質の cDNA を pCI-neo 哺乳動物細胞発現ベクターに組み込み、これを HeLa 細胞にトランスフェクトし、1-1 と同様の実験操作を行った。UBL4A の検出には、一次抗体として抗 Flag M2 抗体を主に使用した。

1-3 細胞分画

MG-132 処理を行った HeLa 細胞を、1%Triton-X100 を含んだ PBS とともにセルスクレイパーを用いて回収し、20,000 xg 20 分の遠心分離を行った。得られた上清を可溶性画分として、1%Triton-X100 で洗浄後の沈殿をアグリソーム画分として分画した。2-メルカプトエタノールの入った SDS サンプルバッファーで上清ならびに沈殿を混和した後、ソニケーションを行い、ウエスタンブロット用の泳動サンプルとした。SDS 電気泳動後ウエスタンブロット法でブロットした。

1-4 NanoBiT コンストラクト作成 3 x Flag タグ挿入

ウエスタンブロット法で検出を容易にするためにベクターに 3 x Flag タグを Inverse PCR 方で挿入した。専用のプライマーで 3 x Flag を Bgl II の直前に挿入した。その後挿入部分をタグ領域の両外にある制限酵素サイト (mul1, xho1@H buffer) で切り出し、Inverse PCR を行っていないベクターにライゲーションした。

使用したプライマー

pBiT 1.1-C 3flag Bgl2 3' ,

tgacggtgattataaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaagAGATCTGCTAGCGATC

GC

pBiT 1.1-C 3flag Bgl2 5' ,

tggtctttagtccatGGTGGCTTTACCAACAGT

pBiT 2.1-C 3flag Bgl2 5' , tggtctttgtagtccatGGTGGCTTTACCACAGTA
伸長時間 4 分、サイクル数 15 回

1-5 NanoBiT コンストラクト作成 UBL4A 挿入

素直にインサートを挿入すると BiT の配列に対してフレームシフトが起きるので、BiT との接合部に多いグリシンになるように 2 塩基追加したプライマーを設計し、増幅した。

Bgl2 Ubl4a 5' , ggagatctATGCAGCTGACGGTGAAGGCGCTGCAG

Ubl4a C end duag +gg Xho1 r ,
ccctcgagccTTTGGAGAAGCCCTTCTCCATTGTC

1-6 NanoBiT コンストラクト作成 BAG6 挿入

1-4 と同様の方法で Inverse PCR を行い BAG6 を 1.1-c 3 x Flag ベクターに挿入した。

Fragment 1 FW Primer (F1_FW) 1.1c3fbgl2 vec ,
CGATGACAAGAGATCTTCTCGTGGGGTGAATCCC

Fragment 1 RV Primer (F1_RV)1.1c3fbgl2 vec ,
GCCACCACCGCTCGAGCCAGGATCATCAGCAAAGG

1-7 NanoBiT システムの条件検討

細胞を播いた、翌日 DNA (LgBiT) : DNA (SmBiT) : PEI MAX = 0.5 (ug) : 0.5 (ug) : 0.5 (ul) /well の条件でトランスフェクションした。48 時間後細胞を 250 ul の PBS で回収した。Nano-Glo® Live Cell Substrate : Nano-Glo® LCS Dilution Buffer=1:19 で混ぜ 5 x の Nano-Glo®Live Cell Reagen を作成した。5 ul の Nano-Glo®Live Cell Reagen と細胞懸濁液 20 ul を別のエッペンにとり混和し 20 分静置し反応後、GloMax® 20/20 Luminometer で蛍光を測定した。

1-8 NanoBiT システムの条件検討 (BAG6 , UBL4A)

1-7 と同様の処理を 1-5, 1-6 で作成したプラスミドを用いて行った。

1-8 アグリソーム形成時の BAG6-UBL4A

トランスフェクション後 24 h から MG-132 処理を開始した。18 h 後に細胞を回収し、測定した。

1-9 熱による凝集体形成ストレス時の BAG6-UBL4A

トランスフェクション後 24 h から 42 °C のインキュベーターで、熱処理を開始した。18 h 後に細胞を回収し、測定した。

1-10 96 well プレートでの NanoBiT

幅広いストレスのスクリーニングを行うために 96 well プレートでの条件検討を行った。
測定はプレートリーダーを用いて行った。

1-11 BAGS 変異体の強制発現

BAGS 変異体を強制発現した細胞で分画実験・染色法を行った。

実験結果

1-1 アグリソームと BAG6 の局在

MG-132 処理した HeLa 細胞を抗ポリユビキチン抗体 FK2 で免疫染色することにより、アグリソームの形成を検出した。その結果、10 μ M MG-132 で 18 h 処理することにより、ポリユビキチン陽性アグリソームが形成することを確認した (図 1-1)。また、抗 BAG6 抗体により、BAG6 がアグリソームに共局在していることを観察できた。以後はこの処理濃度と時間を目安にアグリソーム形成実験を行った。

1-2 アグリソームと UBL4A の局在

HeLa 細胞に Flag タグを付加した UBL4A の発現ベクターをトランスフェクションした後、1-1 で示した条件で免疫染色を行った。その結果、UBL4A は細胞質中に広く局在し、アグリソームに共局在してなかった (図 1-2)。

1-3 細胞分画時のアグリソームの単離と BAG6, UBL4A タンパク質の局在

MG-132 処理した細胞のアグリソーム画分に BAG6 は移行するが、UBL4A は同条件でもアグリソーム画分に移行しない (図 1-3)。

1-4 NanoBiT コンストラクト作成 3 x Flag タグ挿入

シーケンスを確認し挿入を確認した。

1-5 NanoBiT コンストラクト作成 UBL4A 挿入

シーケンスを確認し挿入を確認した。

1-7 NanoBiT システムの条件検討

NanoBIT キット付属のポジティブコントロールとネガティブコントロールでは、測定値 (CPS) が 1000 倍以上の差を検出でき、システムは機能していると考えられた (図 1-7)。

1-8 NanoBiT システムを用いた BAG6 / UBL4A 複合体形成の定量

構築した NanoBiT 実験系は、BAG6 と UBL4A、それぞれの結合ドメイン間の相互作用を十分な感度で検出することが可能であった。さらに、BAG6 との解離定数を 10^{-3} 倍低下させることが示されている UBL4A 点変異体では、NanoBiT 定量値が有為に低下することを確認し、また、BAGS 変異体では F107E 以上に低下することを明らかにした (図 1-8)。

1-9 アグリソーム形成時の BAG6-UBL4A

試行毎の数値のぶれがあり、複数種類の時間や濃度の条件を試しているが、その幅を超えるだけの明確な差を検出には至っていない（図 1-9）。

1-10 熱による凝集体形成ストレス時の BAG6-UBL4A

試行毎の数値のぶれがあり、複数種類の時間や濃度の条件を試しているが、その幅を超えるだけの明確な差を検出には至っていない（図 1-10）。

1-11 96 well プレートでの NanoBiT

コントロールベクターでさえ well ごとに 2 倍程度の差が生じた。また、測定値自体もラージスケールで行っていたときよりも低くなっており、まだ条件検討が必要である。

1-12 強制発現させた BAGS 変異体は、不溶性画分に移行しない

野生型も BAGS 変異体も強制発現した細胞では凝集することがわかった。また、BAGS 変異体の強制発現細胞は MG-132 処理時に vimentin が減少することより死細胞が増加している可能性が得られた（図 1-12）。

1-13. BAGS 変異体の強制発現では細胞数の減少する

染色法では、野生型の強制発現に対して BAGS 変異体の強制発現では細胞数の減少が観察された（図 1-13）。

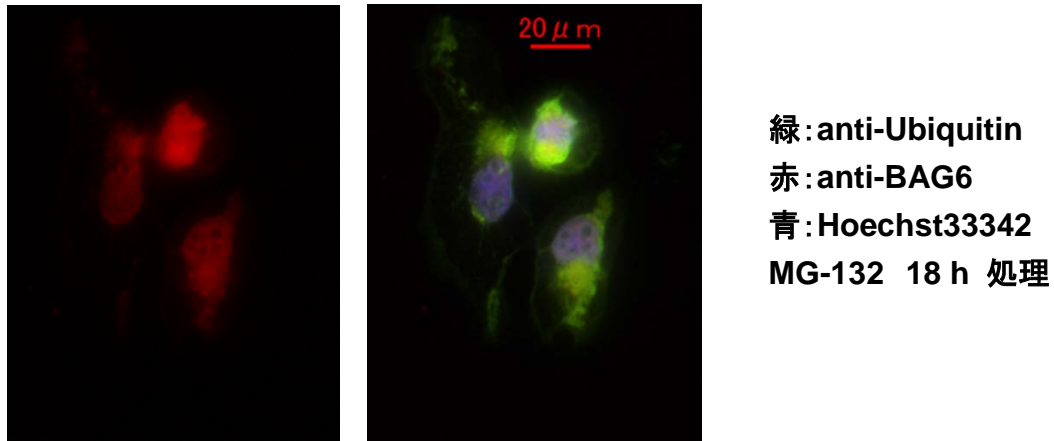


図 1-1. アグリソームと BAG6 との共局在
赤の BAG6 で示す核近傍の局在にユビキチンが共局在していることがわかる

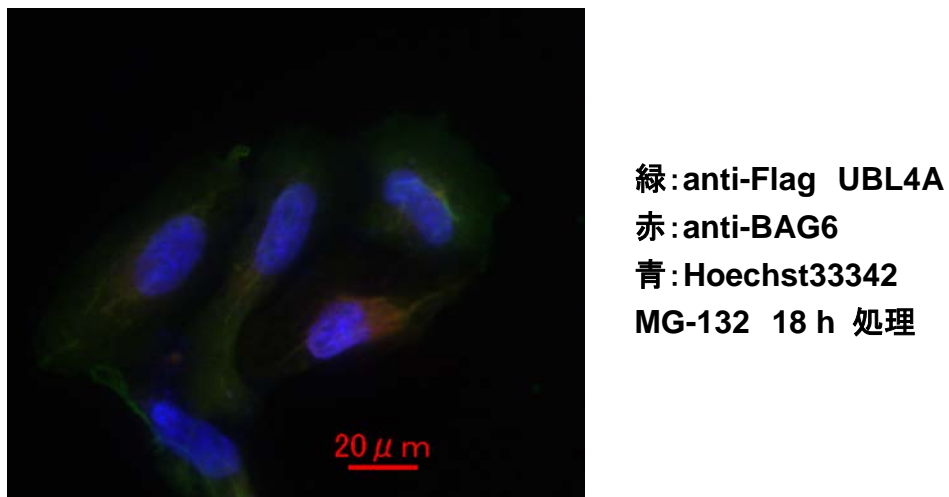


図 1-2 アグリソームと UBLA の局在
アグリソーム画分を示す BAG6 のシグナル (赤) に対して、UBL4A のシグナル (緑) は、一部に重なりが認められるものの、共局在は観察されない

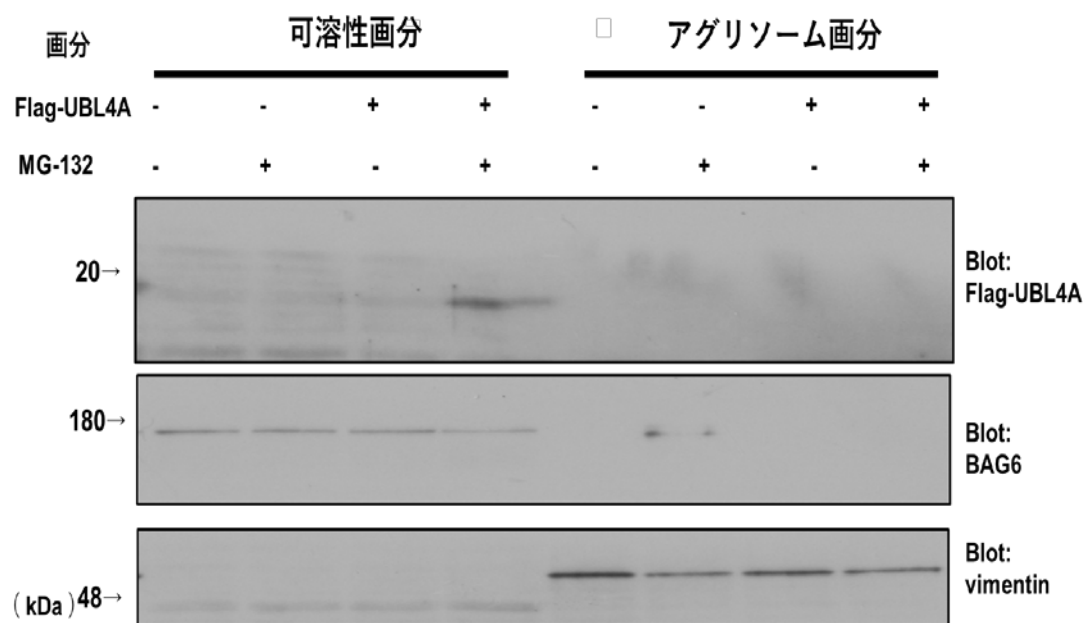


図 1-3 分画時のアグリソームと BAG6, UBL4A の局在

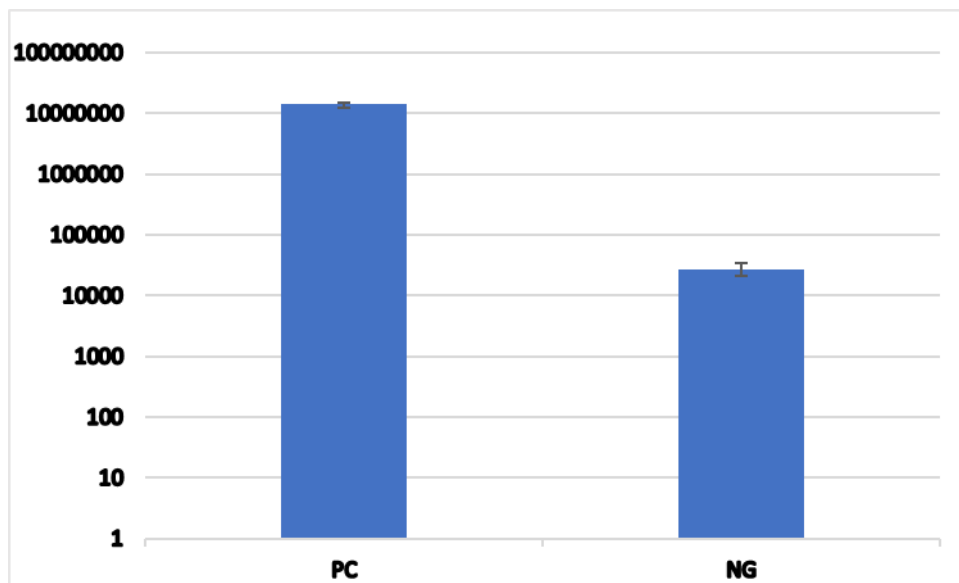


図 1-7 NanoBiT システム付属のポジティブコントロール(PC) 、ならびにネガティブコントロール(NG)を導入した細胞の、NanoBIT シグナルを定量評価した。

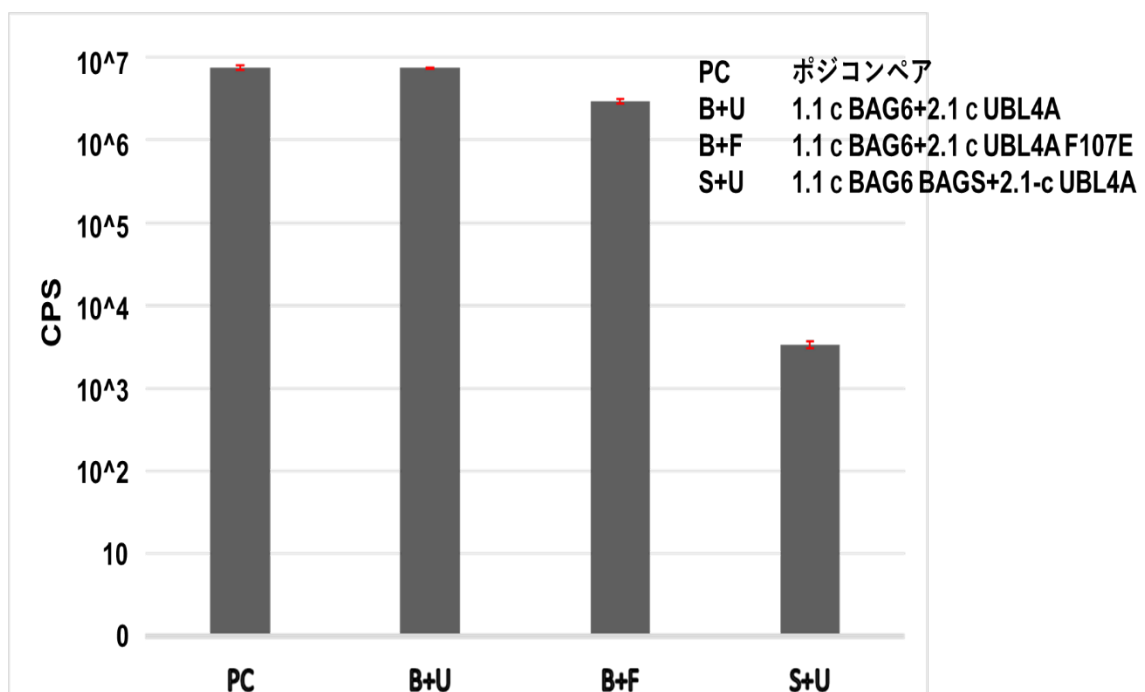


図 1-8 NanoBiT システムを用いた BAG6 / UBL4A 複合体形成の定量。

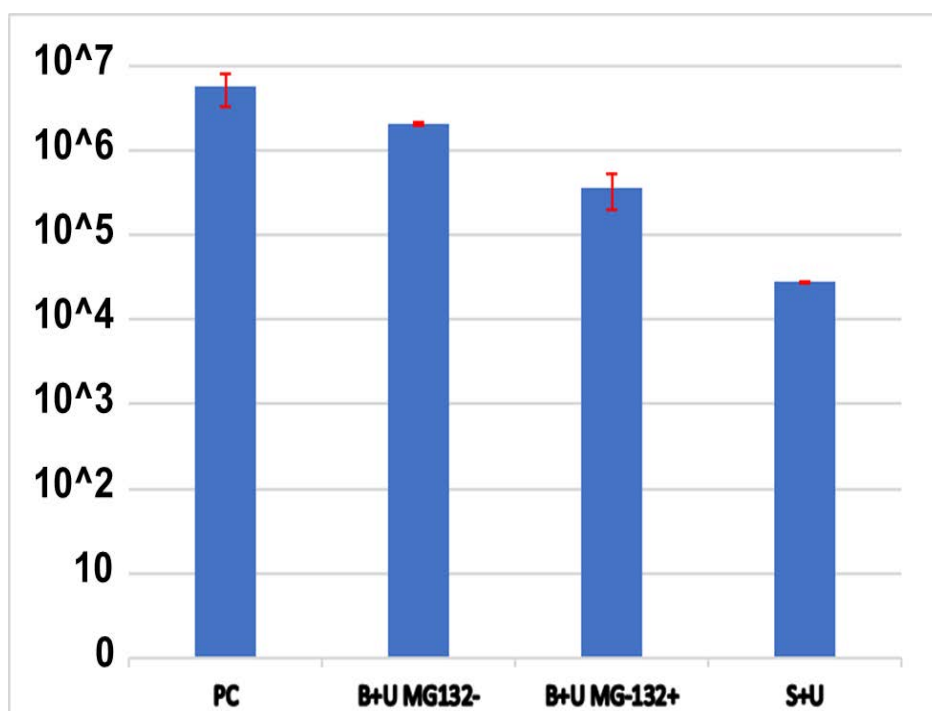


図 1-9 MG132 処理時の BAG6-UBL4A 複合体形成の定量

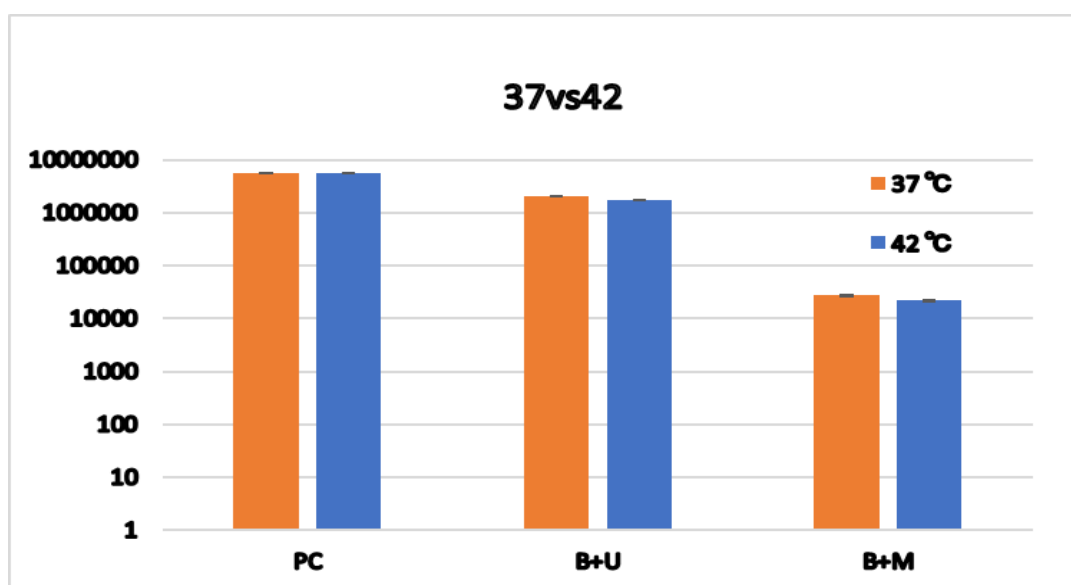
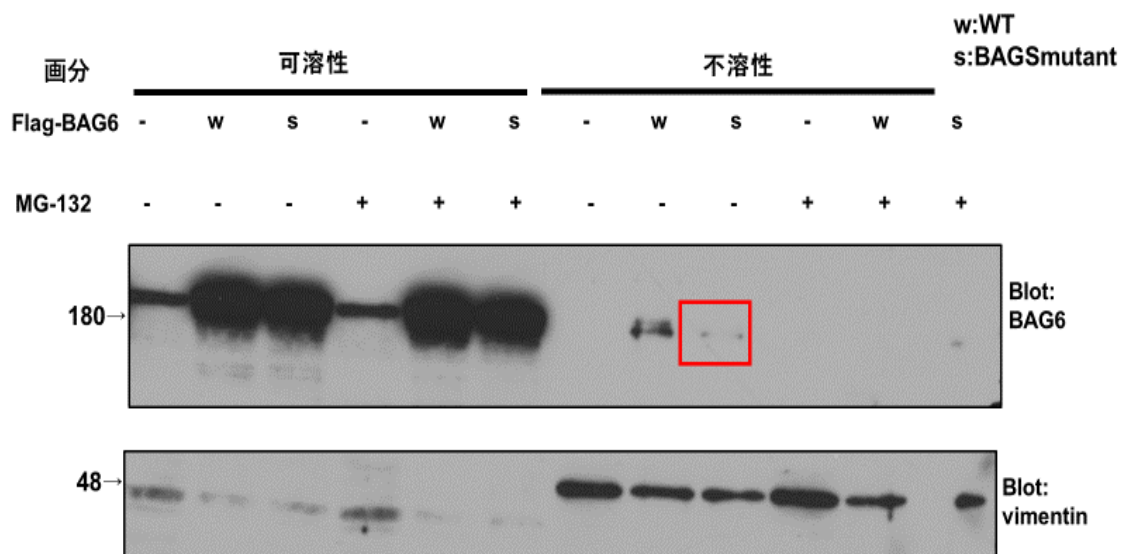


図 1-10 熱ストレス時の BAG6-UBL4A 複合体形成の定量

図 1-11



(kDa)

図 1-12 強制発現させた BAG6 変異体、ならびに野生型 BAG6 の不溶性画分への移行

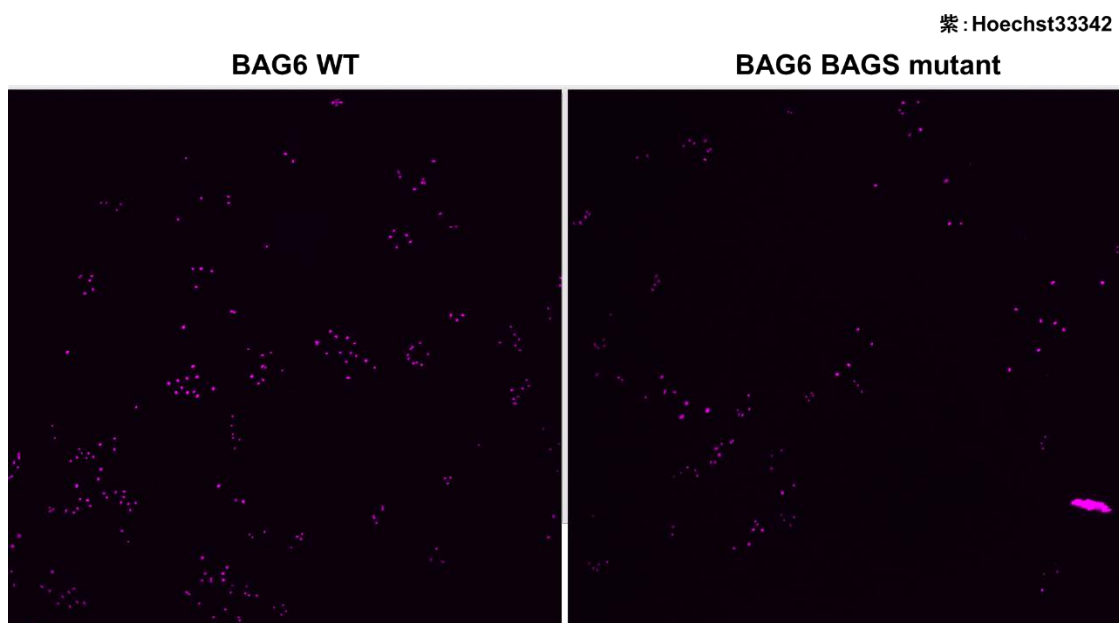


図 1-13 BAG6 変異体、ならびに野生型 BAG6 の強制発現に伴う細胞数の変化。細胞の核

を Hoechst33342 で染色し、細胞数のカウントに用いた。